

200/0228

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における
役割に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 沢村達也

平成14(2002)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における役割 ————— 2
沢村 達也

II. 分担研究報告

1. 酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における役割 ————— 6
沢村 達也
2. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) の ————— 22
過剰発現による心筋細胞アポトーシスと
その細胞内伝達機構に関する研究
長谷川 浩二
3. 酸化 LDL 受容体 LOX-1 の炎症における役割に関する研究 ——— 23
本田 孔士

III. 研究成果の刊行に関する研究 ————— 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 27

I. 総括研究報告

酸化LDL受容体LOX-1の動脈硬化における役割

主任研究者 沢村 達也 国立循環器病センター研究所室長

主任研究者が1997年に発見したレクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の研究を中心に、動脈硬化の病態生理の解明、診断、治療へとつながる基礎的検討を昨年度に引き続き行った。具体的には、酸化ストレスや糖尿病など動脈硬化を促進する諸条件によりLOX-1の発現が増すこと、そしてLOX-1が機能することにより、血管の防御因子として働くNOが消去されることが明らかとなった。また、糖尿病の際に生じるAGE修飾蛋白質がLOX-1リガンドとなることもわかり、糖尿病とLOX-1との強い関連がこのような点でも明らかになった。また、構造解析によりLOX-1のリガンド結合に重要な部位が明らかとなったことから、今後のアンタゴニストの開発に有用な情報が得られた。さらに、心筋細胞のアポトーシスや炎症反応へのLOX-1の関与についても明らかとなり、動脈硬化およびその結果として起きる虚血性疾患に対し、LOX-1が多面的な作用により病態を修飾していると考えられた。

分担研究者

長谷川浩二 京都大学大学院医学研究科
循環病態学 助手

本田 孔士 京都大学大学院医学研究科
視覚病態学 教授

A. 研究目的

血管内皮細胞が血液と諸臓器間の単なるバリアーではなく、細胞間、臓器間のインターフェイスとして情報を変換し、アクティブに信号を発するトランスデューサーとして積極的にはたらいている細胞である。例えば、エンドセリン、一酸化窒素、プロスタサイクリンのような血管収縮、弛緩因子や種々のケモカイン、白血球接着因子のような他の細胞との相互作用に関わる物質を周囲の状況により様々に変化させながら産生している。そしてこの内皮細胞の性質が生活習慣病を引き起こすような状況下では大きく変化していることがわかっている。特に高脂血症及び動脈硬化症では酸化LDLがこのような内皮細胞の機能変化を引き起こす重要な因子であることがわかってきた。すなわち、酸化LDLは内皮細胞にはたらいて、細胞接着因子、白血球遊走因子、細胞増殖因子等の発現誘導、一酸化窒素の放出の抑制などの動脈硬化の成因に重要と考えられる変化を引き起こす。この様な酸化LDLの作用点を明らかにするため、申請者は内皮細胞に発現する酸化LDL受容体をクローニングし、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)と名付けた。本研究では、LOX-1を同定したことを生かして、動脈硬化症のメカニズムをこの分子を利用してできるだけ多くの側面から明らかにすることを試みる。

これまでの研究でLOX-1が酸化LDLの受容体として、想定されていた機能を果たしているという証拠が集まりつつある。本研究の第1の目的はこれをin vivoのレベルで証明していくことである。第2の目的はLOX-1の酸化LDL受容体活性を利用し

て生体内の酸化LDLを検出し、これと動脈硬化性疾患の関連を明らかにしていくことである。

一方、脂質代謝とは別のLOX-1の機能が明らかになって来つつあり、単に酸化LDLの受容体にとどまらない多様な機能をLOX-1は持つようである。第3の目的はこの様な機能の解析を進め、動脈硬化で重要とされている炎症的性質、血栓凝固系の異常についての手がかりを得ることである。単一の分子がこの様に動脈硬化の重要な多くの側面に関わっていることは驚くべき事であるが、これまでに得られた予備的な結果はこれを支持している。

本研究により、国民の重要な死亡原因である虚血性心疾患や、脳卒中の基礎的病態である動脈硬化の機構の理解が進み、その予防に向けた新たな対策が可能になることが期待される。

本年度は主任研究者がLOX-1の発現調節、構造-機能連関、動脈硬化における重要なリスクファクターである糖尿病とLOX-1との関係、LOX-1のリガンド、LOX-1の血管内皮細胞内での機能についての研究を行うとともに、今年度より加わった分担研究者の長谷川、本田が心臓におけるLOX-1の役割および炎症におけるLOX-1の役割について研究を進めた。

B. 研究方法

詳細な研究方法については分担研究報告書に譲るが、LOX-1についての解析を蛋白レベル、遺伝子レベルで培養細胞および個体レベルで行った。

遺伝子組換え等の実験は各所属施設の承認を得て行われ、動物の取り扱いには各所属施設の実験動物取り扱い規定に基づき、動物愛護に配慮して実験を行った。

C. 研究結果、D. 考察

LOX-1そのものの発現調節の解析により、強力な血管収縮物質として知られ、動脈硬化症にも促進的な役割を果たすと考えられているエンドセリン-1によ

りLOX-1の発現が促進することがわかった。また、酸化ストレスの指標として知られる、8-iso-PGF2aが胎盤trophoblast由来の細胞に作用し、LOX-1の発現を誘導したことは、妊娠中毒症の病態生理を明らかにする上で重要であるだけでなく、酸化ストレスにさらされているといわれる動脈硬化巣でのLOX-1の発現にこのような酸化ストレスの結果生じる物質がかかわっている可能性が示唆される。

動脈硬化の重要なリスクファクターである糖尿病の動物モデルで、LOX-1の発現が顕著に増加することが明らかになり、さらにこのような動物の血液中のリポ蛋白質分画にはLOX-1のリガンドとなる物質が蓄積していて、これがLOX-1の発現を誘導している可能性があることが明らかとなった。また、糖尿病の際に生体内に蓄積され、その病態生理に重要な役割を果たすと考えられているAGE (Advanced glycation endproduct) がLOX-1のリガンドとなること、そして、AGEが強力なLOX-1発現誘導物質であることが明らかとなったことから、LOX-1が糖尿病の病態生理においても重要な役割を果たしている可能性があり、糖尿病が動脈硬化の進行に及ぼす影響も含めて今後の更なる検討結果に興味を持たれる。

また、LOX-1の構造機能連関の解析により、リガンド結合に重要なアミノ酸残基を特定したことは、今後のLOX-1アンタゴニスト開発に有用な情報となる可能性がある。また、新たなリガンドとしてフィブロネクチンやバクテリアを同定したことは、LOX-1の生理的な役割を解明する上で重要と考えられる。

一方、酸化LDLのLOX-1への結合が内皮細胞内での活性酸素の産生を誘導し、これがNOを消去する事が明らかとなった。血管弛緩活性にとどまらず多彩な機能、特に抗動脈硬化作用を持つと考えられるNOの減少が血管内皮機能の異常の代表的な変化であり、動脈硬化進行につながる重要な変化と考えられているだけに、LOX-1とのつながりがこのように明らかとなったことは、LOX-1が動脈硬化促進分子として働いている重要な証拠と考えられる。

分担研究者の長谷川は、心筋細胞を用いてエンドセリン-1などの肥大刺激によりLOX-1発現が誘導されること、LOX-1の発現が心筋細胞のp38MAPKを介したアポトーシスを促進する事を示した。これはLOX-1が血管内皮細胞で働き、動脈硬化を促進するだけでなく、その結果として起きる心筋梗塞などの際に、心筋細胞死を積極的に誘導している可能性を示唆するものであり、LOX-1の虚血性心疾患における意義の新たな側面が見えてきたといえる。

また、本田はラットのエンドトキシン誘発ぶどう膜炎のモデルを用いてLOX-1の炎症における役割を解析した。LOX-1の発現は炎症刺激により顕著に増加するとともに、抗LOX-1抗体の投与により炎症反応、白血球の血管壁への接着が抑制され、LOX-1が接着分子として炎症反応に関与していることが明らかとなった。

E. 結論

本年度の研究により、酸化ストレスや糖尿病など動脈硬化を促進する諸条件によりLOX-1の発現が増すこと、そしてLOX-1が機能することにより、血管の

防御因子として働くNOが消去されることが明らかとなった。また、糖尿病の際に生じるAGE修飾蛋白質がLOX-1リガンドとなることもわかり、糖尿病とLOX-1との強い関連がこのような点でも明らかになった。また、構造解析によりLOX-1のリガンド結合に重要な部位が明らかとなったことから、今後のアンタゴニストの開発に有用な情報が得られた。さらに、心筋細胞のアポトーシスや炎症反応へのLOX-1の関与についても明らかとなり、動脈硬化およびその結果として起きる虚血性疾患に対し、LOX-1が多面的な作用により病態を修飾していると考えられた。

このような結果から、動脈硬化促進分子としてのLOX-1の意義はかなり明らかとなってきたと言え、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いた個体レベルでの解析により、今後結論的な結果が出るのが期待される。また、糖尿病との関連や炎症との関連など、昨年度得られた結果にさらに加わる形で、LOX-1の新しい機能が明らかになってきており、動脈硬化および虚血性心疾患のあらゆる局面において、LOX-1が何らかの影響をあたえている可能性がある。LOX-1という単一の物質が、このように病態の多くの段階にかかわっていることは、LOX-1そのものが病態の本質にかかわる分子である事を意味するのかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Halvorsen, B., Staff, A.C., Henriksen, T., Sawamura, T., and Ranheim, T.: 8-iso-Prostaglandin F2 increases expression of LOX-1 in IAR cells. *Hypertension*, 37(4): 1184-1190, 2001
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A.M., Cascio, V.L., Sawamura, T.: The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, 276(17): 13750-13755, 2001
- Chen, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T.: Conserved carboxyl-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized LDL binding. *Biochem J*, 355(Pt2): 289-296, 2001.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.: LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol*, 166:5108-5114, 2001.
- Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 499:215-219, 2001.
- Morawietz, H., Duerrschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284:961-965, 2001.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.:

- Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin. *FEBS Lett*, 504:65-68, 2001.
8. Chen, M., Nagase, M., Fujita, T., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of lox-1 ligand and age. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:962-968, 2001.
 9. Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Sawamura, T., Fujita, M., Yanazume, T., Toyokuni, S., Adachi, S., Kihara, Y. and Sasayama, S.: Activation of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circulation*, 104:2948-2954, 2001
 10. Jono T., Miyazaki A., Nagai R., Sawamura T., Kitamura T. and Horiuchi S.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett*, 511: 170-174, 2002
 11. Morawietz, H., Duerrschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin. Sci.*, in press, 2002.
 12. Yamashiro, K., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Nonaka, A., Honjo, M., Tanihara, H., Nishiwaki, H., Honda, Y., Ogura, Y.: Suppressive effects of histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine on the leukocyte infiltration during endotoxin-induced uveitis. *Exp Eye Res* 73, 69-80, 2001
 13. Yamashiro, K., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Honjo, M., Nonaka, A., Miyamoto, K., Honda, Y., Tanihara, H., Ogura, Y.: Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1553-1560, 2001
- expression of matrix metalloproteases (MMPs) in human coronary artery endothelial cells. Dayuan Li, Lin Liu, Tatsuya Sawamura, and Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
7. Lox-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. Ling Liu, Dayuan Li, Francesco Romeo, Tatsuya Sawamura, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
 8. Myocardial LOX-1 pathway contributes to the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury. Kazuaki Kataoka, Koji Hasegawa, Tetsuhiko Yanazume, Eri Iwai-Kanai, Taku Hirai, Tatsuya Sawamura, Masatoshi Fujita, Ryuji Nohara 74th Scientific Sessions of AHA
 9. Essential role of the cytoplasmic domain in the sorting of LOX-1 to cell surface. Mingyi Chen, Tomoh Masaki, Tatsuya Sawamura 74th Scientific Sessions of AHA
 10. Accelerated atherogenesis in mice overexpressing LOX-1. Tatsuya Sawamura, Kazuhiko Inoue, Tomoh Masaki 74th Scientific Sessions of AHA
 11. LOX-1 is a novel leukocyte-adhesion molecule that contribute to ischemia-reperfusion injury. Megumi Honjo-Sawamura, Kayo Nakamura, Yoshihito Honda, Tomoh Masaki, Tatsuya Sawamura 74th Scientific Sessions of AHA
 12. 酸化LDL 受容体LOX-1と酸化ストレス
沢村達也
第75回日本薬理学会年会

G. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の取得

なし

2. 学会発表

1. Structure-function relationships of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) analyzed by site-directed mutagenesis 沢村達也
第33回日本動脈硬化学会総会
2. 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理学的意義 沢村達也
第51回日本電気泳動学会春季大会
3. 酸化LDL受容体LOX-1の多様な機能と病態生理学的意義 沢村達也
第6回 Vascular Medicine 学会
4. Expression of LOX-1 during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction in rats. Deyuan Li, Victor Williams, Ling Liu, Hongjiang Chen, Francesco Romeo, Tatsuya Sawamura, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of American Heart Association
5. The Role LOX-1, an Oxidized LDL Receptor, in Myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Victor Williams, Dayuan Li, Ling Liu, Tatsuya Sawamura, Tamim Antakli, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
6. LOX-1 mediates the oxidized LDL-induced

Ⅱ. 分担研究報告

酸化LDL受容体LOX-1の動脈硬化における役割

主任研究者 沢村 達也 国立循環器病センター研究所室長

主任研究者が1997年に発見したレクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の研究を中心に、動脈硬化の病態生理の解明、診断、治療へとつながる基礎的検討を行った。具体的には、LOX-1の発現解析から、強力な血管収縮物質であるエンドセリンや酸化ストレスの産物、さらには糖尿病で強い発現を示すことを明らかにした。さらに、糖尿病の病態生理に重要であるAGEがLOX-1のリガンドとなり、かつ、LOX-1の発現を誘導することも明らかとなり、糖尿病とLOX-1との強い関連がここに来て明らかとなってきた。また、フィブロネクチンやバクテリアがLOX-1のリガンドとなりうることもあわせて明らかとなり、LOX-1の生理機能との関連が考えられた。さらに、酸化LDLのLOX-1への作用により、血管内皮細胞から産生されるNOが消去されることがわかり、LOX-1が血管内皮機能の変化と密接に関連している事が明らかとなった。

A. 研究目的

高脂血症及び動脈硬化症では酸化LDLがこのような内皮細胞の機能変化を引き起こす重要な因子であることがわかってきた。すなわち、酸化LDLは内皮細胞にはたらくて、細胞接着因子、白血球遊走因子、細胞増殖因子等の発現誘導、一酸化窒素の放出の抑制などの動脈硬化の成因に重要と考えられる変化を引き起こす。この様な酸化LDLの作用点を明らかにするため、申請者は内皮細胞に発現する酸化LDL受容体をクローニングし、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)と名付けた。本研究では、LOX-1を同定したことを生かして、動脈硬化症のメカニズムをこの分子を利用してできるだけ多くの側面から明らかにすることを試みる。

これまでの研究でLOX-1が酸化LDLの受容体として、想定されていた機能を果たしているという証拠が集まりつつある。本研究の第1の目的はこれをin vivoのレベルで証明していくことである。第2の目的はLOX-1の酸化LDL受容体活性を利用して生体内の酸化LDLを検出し、これと動脈硬化性疾患の関連を明らかにしていくことである。

本年度は特にLOX-1そのものの発現調節、構造-機能連関、動脈硬化における重要なリスクファクターである糖尿病とLOX-1との関係、LOX-1のリガンド、LOX-1の血管内皮細胞内での機能についての研究を行い論文発表に至ったので報告する。

B. 研究方法

①エンドセリン-1によるLOX-1のヒト内皮細胞での発現誘導

細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)はcollagenase IVにより単離を行ない、1.25g/L sodium bicarbonate、100mg/L L-glutamine、20% calf serum、15mmol/L HEPES、100,000U/L penicillin、100mg/L streptomycin、250mg/L fungizone、16.7mg/L endothelial cell growth supplementを含むM199に

て培養を行なった。

LOX-1 mRNAの定量

内皮細胞からの総mRNAはguanidinium thiocyanate / cesium chloride centrifugationにより採取した。PCR産物は標準アガロースゲル電気泳動により分離され、増幅されたPCR fragmentはバンドの密度により判別した。

ウエスタンブロットによる解析

刺激後のHUVECをPBSでwashし、lysis buffer(10mmol/L Tris-HCl, pH7.4; 2% SDS)に溶かし、95℃で10分間incubationして4℃で10分間5000gにて遠心を行なった。BCA protein assayで蛋白定量し、50mgの蛋白につき2×loading buffer(250mmol/L Tris-HCl, pH7.4; 20% glycerol; 4% SDS; 40mmol/L DTT; 2mmol/L Na-EDTA; 0.1% bromphenol blue)と混ぜた。sampleは10% SDS-polyacrylamide gelで電気泳動を行ない、PVDF membraneに転写した。membraneはブロッキング後、室温にて3時間LOX-1抗体とincubationした。TBSTにてwashし、特定の二次抗体と反応させた後、化学発光によりバンドを検出し、デンストメーターにて解析した。

ヒト内皮細胞への酸化LDLの取りこみ

LDLはヒトの血漿から分離し、銅イオンにて酸化して調整した酸化LDLをDiIで標識した。ET-1(100nm/L)でそれぞれの時間で刺激したHUVECにDiI標識酸化LDLを100mg/mlの濃度で3時間作用させた。その後、細胞をFCS入りの培地で5回洗い、2-propanolでDiI標識酸化LDLを抽出して蛍光定量で解析した。また、それぞれのサンプルの蛋白定量も行なった。

阻害剤を使用下でのLOX-1の発現と、酸化LDLの取りこみ

endothelin receptor B 阻害剤:BQ-788(1mmol/L)、protein kinases阻害剤:H7(10mmol/L)、protein kinase C阻害剤:RO-31-8220(1mmol/L)をそれぞれ含んだ培地にて、HUVECをincubationして、その後ET-1で刺激し、LOX-1の発現や、oxLDLの取りこみを確認した。

②JAR 細胞における8-iso-Prostaglandin F_{2α} による、LOX-1 発現の亢進細胞培養

American Type Tissue Collection (ATTC) より入手した、ヒト絨毛癌由来のJAR細胞を、非働化した10%FCSと、2mmol/LのL-glutamineと、50IU/mLのpenicillinと、50mg/mlのstreptomycinを含んだRPMI-1640培地にて培養を行った。ネズミのマクロファージ由来のJ774 A1 (J774)細胞は、非働化した10%FCSと、2mmol/LのL-glutamineと60mg/mlのgentamycinを添加したDMEM培地にて培養した。J774細胞はマクロファージのLOX-1発現のpositive controlとして使用した。

LDLの精製、標識、酸化

LDLは常法により精製して、125I-tyraminylcellobiose (125I-TC)で標識を行い、CuSO₄にて酸化した。

125I-TC標識酸化LDL の細胞への取り込み

125I-TC標識酸化LDLの細胞への取り込みは、前日にpassageを行い24well plateに播いたJAR細胞を使用した。新しい培地とともに10mmol/Lの8-iso-PGF_{2α}、または0.09%ethanolを含む培地で37℃にて6時間、incubationをおこなった。その後、RPMI-1640培地に125I-TC標識酸化LDL (10mg/ml; 100cpm/ng), 2% BSA, 2mmol/L CaCl₂, 10mmol/Lの8-iso-PGF_{2α}または0.09%ethanol (control)を含む培地にて37℃にて24時間までincubationを行った。その後、細胞を回収してから活性を測定した。

JAR細胞からの膜蛋白の単離

JAR細胞は、0.09%ethanol (control)、または100nmol/L 8-iso-PGF_{2α}、または10mmol/L 8-iso-PGF_{2α}を含む培地にて6時間または24時間incubationを行った。その後、protease inhibitorを含んだバッファー (150mmol/L NaCl, 50nmol/L Tris-HCl, 2.5 mmol CaCl₂; pH7.5)で細胞を洗った。JAR細胞の細胞膜は単離され、可溶化されて、その蛋白を定量した。

抗体標識法による酸化LDL Binding Protein の識別

JAR細胞とJ744細胞から得られた可溶化膜蛋白を非還元SDS-PAGEにより分離し、PVDF membraneにblotした。membraneは4℃にて10mg/mlのoxLDLにてincubationを行ったあとに5%skimmed milkと0.2%Tweenを含むTBSにて室温にて2時間ブロッキングを行った。0.5%のskimmed milkを含むTBSTで数回washした後、0.5%のskimmed milkを含むTBSTで希釈した、anti-human apolipoprotein B-100 antibodyで室温にて1時間incubationを行った。洗浄後、horseradish peroxidase標識anti-mouse IgGを用い化学発光により目的とする蛋白を検出した。

ウエスタンブロットによる解析

JAR細胞は0.09% ethanol (control) または、8-iso-PGF_{2α} (10mmol/L) に6時間または24時間の間インキュベーションを行なった。それぞれのサンプルを20mgずつSDS-PAGEで分離し、PVDF membraneにtransferした。membraneはヒトLOX-1と反応する抗ウシLOX-1抗体と反応させた。目的とする蛋白はhorseradish peroxidase標識されたanti-mouse IgGにて化学発光により目的とする蛋白を検出した。

ノザンブロット解析

0.09% ethanol (control) または8-iso-PGF_{2α} (10mmol/L)にて6時間または24時間incubationしたJAR細胞をTrizolによりRNAを抽出し泳動を行ない、Hybond-N membraneにtransferし、human LOX-1 cDNA probe、yeast 18S ribosomal RNAにより検出した。

DNAのtransfection

3mgのDNAに対し、9mgのTransFast試薬を使用しJAR細胞へのtransfectionを行なった。Dr T. Wirthより入手した3x-kB-luciferase (3x-kB-luc) プロモーターはNF-kBと3つの結合部位をもつ。transfectionした細胞をethanol (control) または8-iso-PGF_{2α}にて24時間までincubationした。この細胞をluciferase assayにより解析した。

Oil red O 染色

chamber slidesに前日に播いたJAR細胞に0.9%ethanolまたは8-iso-PGF_{2α} (10mmol/L)と酸化LDL (20mg/ml)を加えた培地で48時間incubationを行なった。24時間ごとに同じ組成の培地と交換した。その後、slideをwashし、細胞を固定し、oil red O染色を行なった。

③糖尿病は血管内皮細胞におけるLOX-1の発現を増強する

動物

12週令オスSprague-Dawleyラット (体重およそ300g) チャールズリバーから購入した。ラットは普通食と水を与え飼育した。0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.0)に溶解したストレプトゾトシン (STZ) 50mg/kgを尾静脈1回投与により糖尿病にしたグループ (n=30)を作成した。糖尿病でない対照グループ (n=20)には、クエン酸緩衝液のみを投与した。尾静脈から採血し、血中のグルコース濃度をglucose test meterにより計測した。糖尿病ラットは、高血糖 (グルコース濃度250mg/dl以上) であることで確かめられた。糖尿病ラットのうち治療をうけた対照として (n=8)、STZ投与3日後から4週間、持続性インシュリンを1日1回皮下注射した。インシュリンの投与量は、空腹時血中グルコース濃度が80mg/dlから130mg/dlの間で維持できるように、個体により調整した (10-40units/rat)。収縮期血圧はtail-cuff plerhysmographyで測定した。すべてのプロトコールは動物実験のガイドラインに準じた。

採血およびリポタンパク質の調製

STZ投与の3日、1、2、4週間後に、一晩絶食しエーテル麻酔したラットの心臓穿刺により血液を採取した。ラットの血清を分離し、血清コレステロール、トリグリセリド値をキットを用いて測定した。VLDL (d<1.006g/ml)、IDL (d=1.006-1.019g/ml)、LDL (d=1.019-1.063g/ml)、HDL (d=1.063-1.210g/ml)はKBr溶液を用いた超遠心により調製した。VLDL/LDL (d<1.063g/ml)分画とLPDS (d>1.210g/ml)もまた調製した。リポタンパク質分画はそれぞれ4℃において滅菌条件で透析した。調製の間リポタンパク質が酸化されるのを防ぐため、10μMブチルヒドロキシルエンと100μM EDTAを加えた。

AGEの調製

BSAは0.5M glucose/PBSと37℃において6週間1.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5M EDTA, 100units/ml ペニシリン, 40units/ml ゲンタマイシンの存在下、滅菌条件でインキュベートした。反応していない糖はPBSによる透析で除いた。対照の糖化していないBSAは糖を含まない他は同様の条件でインキュベートした。

すべてのリポタンパク質およびAGE-BSAのエンドトキシンレベルはLimulus amoebocyte assayにより<0.1ng/mlであることが計測された。

組織の単離

ラットの胸部を切開し血液を吸引し、大動脈を滅菌したPBSで灌流した。大動脈弓からdiaphragmまでの胸部大動脈をRNA調製のために単離した。免疫染色には大動脈弓、胸部大動脈を下り（肋間大動脈の開口部と）、腹部大動脈（腎、腹腔大動脈分岐部）を含む大動脈組織断片を作成した。組織はOCT compoundで、ドライアイスで冷却したイソペンタンを用いて急冷した。6μmの厚さの凍った切片をスライドガラスにのせ-80℃で保存した。大動脈弓や腹部大動脈のうち、分岐部に近接した部分は、切片にflow dividerや分岐そのものが存在することにより示された。

細胞培養

BAEC(ウシ大動脈内皮細胞)を単離し、10% FCSを含んだDMEM培地で培養した。血清を含まないDMEM培地で24時間インキュベートしたあと、刺激を加えた。この実験では6-12回継代した細胞を用いた。

RNA調製およびノザンプロット

total RNAは、ラット胸部大動脈およびBAECからトリゾール試薬を用いて調製した。poly(A)をもつRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムを用いて精製した。ノザンプロットではラットおよびウシLOX-1 cDNAをハイブリダイズさせ、LOX-1 mRNAの相対的な量はGAPDH mRNA量で補正した。

免疫組織化学

STZまたは緩衝液の投与から1, 2, 4週間後、4匹の糖尿病ラットおよび対照ラットから血管組織を得て、免疫組織化学により検討した。1匹のラットのそれぞれの解剖学的位置から、少なくとも10の切片を作成した。切片の内因性ペルオキシダーゼ活性は、0.3% H₂O₂を含むメタノールとインキュベートすることによって抑えた。そして、切片をマウス抗LOX-1モノクローナル抗体(JTX20, 3μg/ml)で一晩4℃においてインキュベートした。二次抗体として、ビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体でインキュベートした後、ストレプトアビジン-HRP、ビオチン化チラミドをシグナル増強のために用いた。抗体の結合は

3-amino-9-ethylcarbazoleを用いて視覚化された。最後に、切片をMayer's hematoxylinで二重染色した。連続切片は、抗Willebrand factorポリクローナル抗体、マウス抗ラットICAM-1抗体で免疫染色した。

競合阻害実験によるLOX-1リガンド活性

ヒトLDLは血漿より超遠心法により調製した。銅イオンを用いたLDLの酸化修飾や1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) 標識は、既述の方法に準じた。ウシLOX-1を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)-K1細胞は、10μg/ml プラストサイジンS

を添加したHam's F-12培地/10%FCSで培養した。

BLOX-1-CHO細胞におけるDiI酸化LDLの結合と取り込みは既述の方法により定量した。12well plateに培養した一層のBLOX-1-CHOを1mlのF-12培地中でDiI酸化LDL(3μg/ml)と、糖尿病ラット血清(5-20%(v/v))などcompetitorの存在下、非存在下でインキュベートした。3時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、細胞に蓄積したDiI酸化LDL量をsupectrofluorometerにより蛍光強度から定量した。

統計解析

データは平均値±S.E.Mで表した。データ間の有意差はStudent's t testで評価した。複数のグループ間の比較はDuncant's testとone-way ANOVAによる。P<0.05を有意とした。

④LOX-1は内皮細胞のAGE受容体として機能する

AGE-BSAおよびアルデヒド修飾タンパク質の調製0.5M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)10ml中で、BSA 2.0gをD-glucose 3.0gと37℃において40週間インキュベートしたあと、PBSで透析した。酸性条件下における加水分解後のアミノ酸解析によって、AGE-BSAのリジン修飾の程度は、全リジン残基のうち75.7%であった。100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)10ml中で、BSA(2mg/ml)は37℃において14日間、33mM methylglyoxal (MG)、glycoaldehyde、3-deoxyglucoseとインキュベートし、PBSで透析した。AGE-BSAはIodogenにより¹²⁵I標識され、そのspecific radioactivityは850cpm/ngであった。

リポタンパク質の調製

LDL(d=1.019-1.063)は、一晩絶食した健常者から採取した新鮮血漿から超遠心により分離した。酸化LDLはLDL(0.1mg/ml)を5μM CuSO₄37℃で16時間インキュベートし、続いて1mM EDTAを加え冷却することにより調製した。酸化LDLはMcFarlaneの方法により¹²⁵I標識され、そのspecific radioactivityは510cpm/ngであった。

細胞培養

ウシLOX-1を過剰発現させたCHO細胞(BLOX-1-CHO)は、BLOX-1をCHO細胞にトランスフェクションした後選択された。細胞は、10μg/ml プラストサイジンS、10% FCSを含むHam's F-12培地で5% CO₂条件下で培養した。ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)は、ウシ大動脈の内表面をかきとることにより単離され、10% FCSを含むDMEM培地で培養した。BLOX-1-CHO細胞(4×10⁴/well)、BAEC(8×10⁴/well)を24 wellプレート(直径15mm)にまき、2日間培養し実験に用いた。

細胞を用いた実験

endocytic degradation assayでは、24 wellプレートで培養したBLOX-1-CHO細胞を、各濃度の[¹²⁵I] AGE-BSAもしくは[¹²⁵I] 酸化LDLと、過剰量の非標識リガンドの存在下もしくは非存在下で、3% BSAを含むDMEM培地(medium A)1.0mlで37℃において6時間インキュベートした。培養液0.75mlを40% trichloroacetic acid (TCA) 0.3mlと混合した。混合液に0.7M AgNO₃ 0.2mlを加え、2500×gで10分間遠心した。上清0.5ml中のTCA可溶性のradioactivityを計測し、endocytic degradationを決定した。残った細胞は1% BSAを含むPBS 1mlで2回洗い、PBS 1ml

で2回洗った。細胞は、0.1N NaOH 0.5mlで溶解し、cell-associated radioactivityと細胞のタンパク質を決定した。Binding assayでは、BLOX-1-CHO細胞もしくはBAECを、各濃度の $[^{125}I]$ AGE-BSAもしくは $[^{125}I]$ 酸化LDLと、過剰量の非標識リガンド、抗BLOX-1抗体、コントロールIgGの存在下もしくは非存在下で、medium A 1.0mlで4℃において90分間インキュベートした。それぞれのウェルは1% BSAを含む冷却PBSで2回洗い、さらに冷却PBSで2回洗い、cell-bound radioactivityを決定した。抗LOX-1抗体はマウスから調製された。

⑤LOX-1を介したフィブロネクチンに対する接着 接着アッセイ

細胞は、定常状態においてLOX-1の高発現が確認されているウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) とウシLOX-1遺伝子をCHO-K1細胞に安定発現させたBLOX-1-CHOを用いた。上記の細胞はいずれもウシLOX-1を高発現していることを確認している。またコントロールとしてCHO-K1細胞を用いた。

5mM EDTAにて培養皿より細胞を剥がし、細胞を培養液で2回洗ったのち、一方は5mM EDTAを含む培養液に 1×10^5 /mlになるように懸濁し2価イオンをキレートした場合の接着測定用の細胞懸濁液とし、もう一方はEDTAを含まない培養液に 1×10^5 /mlになるように懸濁し、2価イオンをキレートしなかった場合の接着測定用の細胞懸濁液とした。

上記のように処理した細胞をフィブロネクチンをコートした35mm培養皿もしくはタイプIコラーゲンをコートした35mm培養皿にまき、37℃、30分培養後、接着していない細胞を洗い流した後培養皿に接着した細胞の数を位相差顕微鏡下で測定した。阻害実験においては、フィブロネクチンまたはコラーゲンコートした培養皿に細胞をまく15分前に阻害物質をあらかじめ加えておいた。

⑥LOX-1を介したグラム陽性菌、グラム陰性菌の接着

細菌接着アッセイ

細胞は、定常状態においてLOX-1の高発現が確認されているウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) とTNF- α (10ng/ml、24時間) 刺激によりLOX-1を発現誘導させたウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) とウシLOX-1遺伝子をCHO-K1細胞に安定発現させたBLOX-1-CHOを用いた。上記の細胞はいずれもウシLOX-1を高発現していることを確認している。

FITC標識した黄色ブドウ球菌、大腸菌を37℃1時間の条件下でBAEC、TNF- α (10ng/ml、24時間) 刺激したBAEC、BLOX-1-CHOと共培養した。共培養1時間後、培養液で2回、PBSで2回細胞を洗うことで細胞に接着していない細菌を取り除き、細胞に接着している黄色ブドウ球菌、大腸菌を共焦点顕微鏡にて観察した。また同様の処理をした細胞をトリプシンにて培養皿より剥がし、フローサイトメトリーにてFITC標識した黄色ブドウ球菌、大腸菌の細胞への接着を、蛍光強度を指標として定量的に解析した。

細菌の、細胞への接着が、LOX-1を介した作用であることを確認するために、中和抗体として働くことが

確認されている抗LOX-1抗体やLOX-1のリガンドとして知られているpoly (I)やpoly (C)を用いて、細胞への接着が阻害されるかどうかを確認した。阻害実験においてはFITC標識した黄色ブドウ球菌、大腸菌と細胞を共培養する15分前に、抗LOX-1抗体 (30ug/ml)、poly (I)、poly (C) (100ug/mlもしくは500ug/ml) にて細胞を前処理した。

また静的状態での接着のみならず動的な状態での細菌の接着を調べるために、振とう機にて培養皿を1分間に36回振とうさせたときの、黄色ブドウ球菌、大腸菌の、細胞への接着についても検討した。

⑦LOX-1のレクチン様ドメインにおける種の間で保存されたC末端に位置するアミノ酸残基のOxLDL結合における必要性

ブタLOX-1 cDNA クローニングとシーケンス解析

ブタの胸部大動脈は屠殺業者から入手した白ブタのものを用いた。ブタの血管内皮細胞を材料に、既述の如く λ gt10にcDNA断片 (>500bp) を組み込んでcDNAライブラリを構築した。ヒトLOX-1cDNAの翻訳領域をプローブにして、約 5×10^5 のクローンよりスクリーニングを行なった。その結果 >1.5kbの全長オープンリーディングフレームのインサートを含む3つの陽性クローンが同定された。そのインサートをシーケンス解析のためpUC18ベクターにサブクローニングした。シーケンスはジデオキシ法によるサイクルシーケンシングを両鎖について行い、LI-COR DNA シーケンサー (モデル4000L) で読み取った。核酸及びアミノ酸配列はGene Works (Intelligenetics) によりマッキントッシュ上で他の種と比較して解析した。

リポタンパク質の調製

ヒトLDL (1.019-1.063 g/ml) は健康人より得た血漿を4℃下で超遠心機で分離することにより得た。酸化LDLは7.5 μ M CuSO₄と共に12時間37℃でインキュベーションすることにより得た。得られた酸化LDLの酸化度は、過酸化脂質量であるthiobarbituric acid-reactive substancesの定量 (TBARS測定キット、和光純薬) とアガロース電気泳動の移動度 (TITAN GEL LIPOPROTEIN Kit) によって定量した (TBARS: 約10nmol/mg、相対電気泳動移動度: 酸化LDL/LDLの値2.10)。得られた酸化LDLをDiIにより既述の方法によりラベルした。

細胞培養

すべての細胞培養は37℃で5%二酸化炭素存在下で行なった。野生型CHO-K1細胞は10% FCS入りHam' s F-12で培養した。ウシLOX-1安定発現型

CHO-K1 (bLOX-1-CHO) は10 μ g/ml blasticidin S 入りHam' s F-12-10%FCSで培養した。

プラスミドの構築と変異体作製

欠損変異体作製

野生型及び変異型ウシLOX-1 cDNAをストップコドンを含めてPCRにかけ、pCR3.1 (invitrogen) にサブクローニングした。さらに、ストップコドンを含まない逆向きプライマーによりPCRにかけたフラグメントをpcDNA3.1/V5-His-TOPOベクターにサブクローニングして、C末端でV5のエピトープと融合したものを作製した。

点変異体作製

レクチン様ドメインに存在する目的とするアミノ酸をQuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.)を用いて置き換えた。bLOX-1 cDNA-pCR3.1をテンプレートとして変異部分を含む2つの相補的プライマー (125ng) と50ngのテンプレートを反応バッファー中で95°C 30秒、55°C 1分、68°C 14分でこのサイクルを18回繰り返してPfu polymeraseによりDNA合成を行った。元のテンプレートは37°C 1時間で10ユニットのDpn Iでインキュベートして除いた。3つのタイプのアラニン変異体を得られ、Lys262 and/or Lys 263は変異プライマーによりTable 1のようにアラニンに置換した。複数の変異を含むプラスミドは、個々に変異反応を行なうことにより作製した。変異型cDNAはABI Dye Terminator kitおよびABI model 310シーケンサーによって、そのシーケンスを確認した。

変異型および野生型bLOX-1 cDNAのCHO細胞への導入

野生型CHO-K1を 1.5×10^6 個100mmディッシュに撒いたものに20 μ gのプラスミドをLipofectamine 2000 (Gibco)を用いてトランスフェクションを行なった。2日目に細胞をトリプシン処理により回収して12-wellディッシュまたは2-wellチャンバースライドに撒きなおした。トランスフェクションから48時間後に細胞を解析に用いた。トランスフェクション効率の補正のためにpcDNA3.1/LacZを変異プラスミドとともにトランスフェクションしておき、 β -galactosidase活性によりLOX-1活性を補正した。

免疫蛍光染色

LOX-1導入CHO細胞へのDiI-0xLDLの結合及び取り込みを蛍光顕微鏡により調べた。細胞を10 μ g/mlのDiI-0xLDLと4°Cまたは37°Cで3時間インキュベートした。氷上で冷却したPBSを用いて3回洗い、3.8% (v/v) paraformaldehyde-PBSで15分間固定を行なった。ブロッキングを正常ヤギ血清入り0.1% BSA-PBSを用いて行った。LOX-1もしくはV5エピトープに対し染色を行なうために、抗LOX-1もしくは抗V5抗体を1時間反応させ、FITCラベルヤギ抗マウスIgGを1時間、10%FCS-PBS中で反応させた。サンプルはカバースリップで2% triethylenediamine-80%グリセロールで封入した。細胞はZeiss Axiovert microscopeで観察した。蛍光画像はKodak Ektachrome filmで記録した。

抗LOX-1抗体の作製

抗LOX-1モノクローナル抗体はBalb/cマウスにbLOX-1 CHO細胞を免疫することにより得た。Splenoocyte 由来のハイブリドーマを所定の手順により調製し、bLOX-1-CHOへの結合を指標にスクリーニングした。機能阻害抗体 (JTX-20) は、さらにbLOX-1-CHO細胞へのDiI-0xLDLの結合及び取り込み阻害を指標にスクリーニングした。

ウェスタンブロット解析

細胞を62.5mM Tris-HCl (pH7.4)/2%SDS/10% glycerolに溶かしBCA protein assay kit (Pierce Chemical)によりBSAを標準としたタンパク定量した。サンプル60 μ g (タンパク質) をSDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに (Immobilon, Millipore) に転写した。メンブレンは抗LOX-1抗体 5-2及びJTX20、

抗V5抗体とインキュベートした後、HRP-標識ウマ抗マウス抗体とインキュベートした。バンドはVectastain Elite ABC kit (Vector)により可視化した。

DiI-0xLDLの結合及び取り込み

野生型及び変異型ウシLOX-1を導入したCHO-K1細胞若しくはmock (vector)トランスフェクションされたCHO-K1細胞へのDiI-0xLDLの結合は、既述の如く12-wellディッシュを4°Cでインキュベートした後に、測定した。リガンド結合-取り込み活性は蛍光ラベルした0xLDLの取り込みによって測定した。トランスフェクションを行った細胞を10 μ g/mlのDiI-0xLDLと37°Cで3時間インキュベートした。PBSで3回洗った後、蛍光顕微鏡で細胞内のDiI-0xLDLの取り込みを検出した。細胞を0.2mlのlysis bufferを用いて室温下20分間振盪することにより可溶化し、各サンプルについてタンパク質および β -galactosidaseの定量を行った。細胞に取り込まれたDiI-0xLDL量を測定するために、各wellに0.3mlのイソプロパノールを加えシェーカー上で15分間振盪した。抽出されたDiIの蛍光を蛍光プレートリーダー (Spectro Fluor, Tecan) で測定した。DiI-0xLDLとともに50倍量の非標識の0xLDLを加えることにより非特異的結合を補正した。

⑧LOX-1のレクチン様ドメインにおける塩基性アミノ酸リガンド結合における必要性

リポタンパク質の調製

ヒトLDL (1.019-1.063 g/ml)は健康人より得た血漿を4°C下で超遠心機にて分離した。酸化LDLは7.5 μ M CuSO₄と共に12時間、37°Cでインキュベーションすることにより得た。得られた酸化LDLの酸化度は、過酸化脂質量であるthiobarbituric acid-reactive substancesの定量 (TBARS測定キット、和光純薬) とアガロース電気泳動の移動度 (TITAN GEL LIPOPROTEIN Kit) によって定量した (TBARS: 約10nmol/mg、電気泳動相対移動度: 酸化LDL/LDLの値 2.10)。得られた酸化LDLは1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI, Molecular Probes)により既述の方法によりラベルした。

プラスミドの構築と変異体作製

欠損変異体作製

ウシLOX-1の野生型及び欠損変異体のcDNAは、ウシLOX-1 cDNAをテンプレートとしてPCRで増幅し、pcDNA3.1/V5-His-TOPOベクター (Invitrogen) にサブクローニングすることによりC末端でのV5エピトープと融合させた。今回用いたPCRプライマーはTable 1に示した。野生型及び変異体LOX-1タンパク質の構造の模式図をFig. 2に示した。ウシLOX-1のネックドメインを欠損させるにあたって、ウシLOX-1のレクチンドメインを5' EcoRVと3' Sal Iサイトを含んだPCRプライマーにより、野生型ウシLOX-1 cDNAをテンプレートとして増幅し、それらのサイトにより、EcoRVとSal Iで切断したpCDNAウシLOX-1-V5に組み込んだ。ウシLOX-1変異体 Δ 195-225 (3番目と4番目のシステインの間) を作製するため、ウシLOX-1の226-270の断片を5' EcoRIと3' Not Iサイトを含ん

だ PCRプライマーによりpCDNAウシLOX-1-V5をテンプレートとして増幅し、これらのサイトをEcoRIとNot Iにより切断したpCDNAウシLOX-1-V5に組み込んだ。

点変異体作製

レクチン様ドメインのあるアミノ酸についてpCDNAウシLOX-1-V5をテンプレートとしてQuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)をもちいて行なった。システイン、リジンおよびアルギニン残基を変異プライマーを用いてTable 1のようにアラニンに変換した。2箇所以上の変異を含むプラスミドの作製は個々の変異について手順を踏んだ。変異体cDNAはシーケンス確認を行なった。

変異体ウシLOX-1 cDNAのCHO細胞への導入

野生型CHO-K1細胞はHam's F-12 (Gibco)/10%FCSにより既述の如く維持した。野生型CHO-K1を1.5×10⁶個100mmディッシュに撒いたものに20μgのプラスミドをLipofectamine 2000 (Gibco)を用いてトランスフェクションを行なった。2日目に細胞をトリプシン処理により回収して12-wellディッシュまたは2-wellチャンバースライドに撒きなおした。トランスフェクションから48時間後に細胞を解析に用いた。トランスフェクション効率の補正のためにpCDNA3.1/LacZを変異プラスミドとともにトランスフェクションしておき、β-galactosidase活性によりLOX-1活性を補正した。

ウェスタンブロット解析

細胞を62.5mM Tris-HCl (pH7.4)/2%SDS/10% glycerolに溶かし、等量のタンパク質量のサンプルをSDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに (Immobilon, Millipore) に転写した。メンブレンは抗LOX-1抗体 (#5-2)とインキュベートした。免疫蛍光染色と共焦点顕微鏡による観察

LOX-1導入CHO細胞へのDiI-0xLDLの結合及び取り込みを蛍光顕微鏡により調べた。細胞を10μg/mlのDiI-0xLDLと37°Cで3時間インキュベートした。氷上で冷却したPBSを用いて3回洗い、3.8% (v/v) paraformaldehyde-PBSで15時間固定を行なった。ブロッッキングを正常ヤギ血清入り0.1% BSA-PBSを用いて行った。V5エピトープに対し染色を行なうために、抗V5抗体を1時間反応させ、FITCラベルヤギ抗マウスIgGを1時間、10%FCS-PBS中で反応させた。サンプルはカバースリップで2% triethylenediamine-80%グリセロールで封入した。細胞は共焦点顕微鏡 (Fluoview, Olympus)で観察した。

DiI-0xLDLの結合および取り込み

野生型及び変異型ウシLOX-1を導入したCHO-K1細胞若しくはmock (vector)トランスフェクションされたCHO-K1細胞へのDiI-0xLDLの結合は、12-wellディッシュ中で4°Cでインキュベートした後に、既述の如く測定した。リガンド結合—取り込み活性はDiIの蛍光を検出することにより測定した。トランスフェクションを行った細胞を10μg/mlのDiI-0xLDLと37°Cで3時間インキュベートした。PBSで3回洗った後、蛍光顕微鏡で細胞内のDiI-0xLDLの取り込みを検出した。細胞を0.2mlのlysis bufferを用いて室温下20

分間振盪することにより可溶化し、各サンプルについてタンパク質およびβ-galactosidaseの定量を行った。細胞に取り込まれたDiI-0xLDL量を測定するために、各wellに0.3mlのイソプロパノールを加えシェーカー上で15分間振盪した。抽出されたDiIの蛍光を蛍光プレートリーダー (Spectro Fluor, Tecan)で測定した。DiI-0xLDLとともに50倍量の非標識の0xLDLを加えることにより非特異的結合を補正した。

⑨酸化LDLのLOX-1への結合は活性酸素の産生を通じて血管内皮細胞内のNO濃度を減少させる

LDLの単離と酸化、修飾

12時間絶食した健常者からEDTA採血を行い、NaBr法によってLDLを単離した。単離したLDL (1.7mg/ml)を5μMの硫酸銅と37°Cで18時間インキュベートして酸化LDLを作製した。酸化の程度はチオバルビタール酸反応物質によって測定した。マロンジアルデヒド修飾LDL (MDA-LDL)、アセチル化LDLもこれまでに報告された方法にて作製した。

細胞培養

実験にはウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC)、CHO-K1、遺伝子組み換えによりウシLOX-1をCHO-K1に恒常的に発現させたBLOX-1-CHOを用いた。

活性酸素種、及びスーパーオキシドの定量

細胞内の活性酸素の濃度は、2', 7'-dichlorofluorescein diacetateの酸化を指標にしたフローサイトメトリーによって検出した。一方、細胞内のスーパーオキシドの濃度は、hydroethidine (HE)のethidiumへの変換を指標にしたフローサイトメトリーによって検出した。また、細胞培養液中の過酸化水素は蛍光光度測定法で、同じく細胞培養液中のスーパーオキシドはチトクロームcの減少を指標にした光学的手法により測定した。

実際には、BAECに10μMの2', 7'-dichlorofluorescein diacetate、あるいは1μMのHEを20分間反応させた後、LDL、酸化LDL、MDA-LDL、アセチル化LDLを5mMのアルギニンと3μMのtetrahydrobiopterin (TB4)とともに5分間反応させる。その後BSA入りのPBSで細胞を洗浄した後、1サンプルあたり7000個の細胞をフローサイトメトリーで解析して活性酸素、及びスーパーオキシドの濃度を測定した。

反応の特異性を確かめるために、ビタミンC、trolox、プロブコール、LOX-1抗体を用いて細胞の前処理を行った。また、スーパーオキシドの産生にどの酸化的経路が関与しているのかを調べるためにL-NMMA、L-NAME、allopurinol、asprin、diphenyleiodonium (DPI)をアルギニン、TB4とともに反応させた。

NOの定量

細胞内のNO濃度は4, 5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA)を用いてフローサイトメトリーによって検出した。DAF2-DAは生理的な条件下でNOを直接検出することができる蛍光指標物質である。実際にはBAECに10μMのDAF-2 DAを10分間反応させた後、アルギニン、TB4とともに100nMのプラジキニンや150mMのトロンピンで5分間細胞を刺激する。その後BSA入りのPBSで細胞を洗浄した後、1サンプルあたり7000個の細胞をフローサイトメトリーで解析し

て細胞内のNOの濃度を測定した。DAF-2DAを加えた後、NOに依存して蛍光シグナルが得られていることを証明するために、L-NMMA、D-NMMAで30分間前処理を行った。また、細胞内のNOの濃度と酸化LDLとの関連を調べるため、DAF-2 DAを加えた後にLDL、酸化LDL、MDA-LDL、アセチル化LDLをアルギニン、TB4とともに0.5~15分間反応させて、細胞内のNOの濃度を測定した。さらに、細胞内のNOの濃度と酸化LDLとの関連が、活性酸素の産生とどのように関わっているのか、また反応特異性はあるのかを調べるために、ビタミンC、LOX-1抗体を用いて細胞の前処理を行った。

eNOS活性の測定

酸化LDLとeNOSとの関連を調べるため、eNOSがアルギニンをシトルリンへと変換させる代謝能を指標にしてeNOSの活性を調べた。実際には、BAECの溶解液に2mMのNADPH、230 μMの塩化カルシウム、3 μMのTB4、10 μMの3Hアルギニン (0.2 μCi) を加え、37°Cで20分間反応させてeNOSの活性を測定した。また、EDTAの存在下で同じ実験を行い、iNOSの活性についても調べた。

C. 研究結果、D. 考察

①エンドセリン-1によるLOX-1のヒト内皮細胞での発現誘導

HUVECにおけるET-1によるLOX-1発現の亢進
ET-1とのincubationの時間が1時間を最大として、ET-1刺激によるLOX-1 mRNAの発現は上昇した。またET-1の濃度に依存してmRNAの発現も上昇する。ETBレセプターのアンタゴニストBQ-788(1mmol/L)を使用するとLOX-1 mRNAの発現が阻害された。このことを蛋白レベルで確認するために行なったウエスタンブロットにおいてもET-1(100nmol/L)によりLOX-1蛋白の発現が上昇した。

ETBを介したHUVECにおけるET-1刺激による酸化LDLの取りこみ

LOX-1 mRNAの蛋白発現の増加を確認するために、HUVECをET-1で刺激後に、DiI標識した酸化LDLの取りこみを行なった。LOX-1 mRNAの発現と同様に、1時間後を最大に約2倍で取りこみが確認された。また、ETBレセプターのアンタゴニストを用いた実験により酸化LDLの取りこみの増加は見られなかったことから、ETBレセプターを介するということが示された。しかしprotein kinases阻害剤H7では酸化LDLの取りこみの増加は阻害されなかった。同様にprotein kinase C阻害剤RO-31-8220でも阻害されなかった。

考察

この実験では、ヒト内皮細胞においてET-1によりLOX-1のmRNAと蛋白が時間、濃度依存的に増加することが確認された。これはET-1によって酸化LDLの取りこみも増加することと一致している。この現象はET-1のレセプターであるETBを介するということが示された。ヒトの内皮細胞ではETBが発現しており、ET-1の動脈硬化促進作用はETBを介していることから理由のひとつである。ETBの動脈硬化促進作用はNAD(P)H oxidaseによるスーパーオキシドの産生によるものである。ET-1は生体内において

LDLを酸化LDLに酸化し、酸化LDLの取りこみも増大させているのである。

酸化LDLの取りこみにより内皮障害が起こり、内皮依存性の血管弛緩反応が障害される。内皮での接着分子の発現の増大により単球、マクロファージの浸潤が起こり、血管平滑筋での血管増殖因子が分泌され血管肥厚が起こる。酸化LDLの動脈硬化促進作用に内皮傷害からの回復を遅らせる作用、血管細胞への毒性、内皮細胞のアポトーシスの誘導がある。それゆえET-1による刺激で内皮細胞への酸化LDLの取りこみが増加する現象は動脈硬化初期の段階、つまりマクロファージが動脈硬化の進展に作用する以前の段階に起こっているのである。

LOX-1を介した酸化LDLの取りこみは高血圧と動脈硬化の関係を示唆している。高血圧などで体内でのET-1濃度が上昇すると内皮細胞でLOX-1を介した酸化LDLの取りこみが増加し内皮障害や動脈硬化を促進させる。エンドセリンのレセプターを阻害することは新たな動脈硬化の治療法となる可能性がある。

②JAR細胞における8-iso-Prostaglandin F_{2α}による、LOX-1発現の亢進

125I-TC 酸化LDLの細胞への取りこみ

JAR細胞への、125I-TC標識した酸化LDLの取りこみを確認すると、8-iso-PGF_{2α}を含んだ培地でincubationした細胞では、6時間の早い時期で高い取りこみを示した。8-iso-PGF_{2α}がLOX-1への酸化LDLの結合に影響しないことも確認した。

抗体標識法による解析

JAR細胞を6時間、8-iso-PGF_{2α}(10mmol/L)でincubationしたものはcontrolと比べ、LOX-1蛋白を示す50kDの位置に1.7倍の酸化LDLとの結合蛋白のバンドがみられた。24時間incubationしたものではcontrolと比べ2.3倍の高い発現を示した。しかし、100nmol/Lの8-iso-PGF_{2α}では差が見られなかった。この実験ではポジティブコントロールとしてJ744細胞を使用した。

Western Blotによる解析

JAR細胞でのLOX-1蛋白のバンドは50kDに観察される。この位置に8-iso-PGF_{2α}(10mmol/L)で、6時間incubationしたJAR細胞ではコントロールに比べ1.4倍の蛋白が観察された。24時間ではコントロールの細胞と差はなかった。

mRNAの発現

8-iso-PGF_{2α}(10mmol/L)と6時間incubationしたJAR細胞はコントロールに比べ1.4倍mRNAの発現が上昇している。24時間のincubationでは1.1倍となるが統計学的には差はない。

NF-κBのJAR細胞へのtransfection

JAR細胞へNF-κBをtransfectionした細胞では、incubationした8-iso-PGF_{2α}の濃度に応じて、コントロールに比べ1.6倍から12.8倍のluciferase activityがあった。

Oil Red O 染色

酸化LDLを加えてincubationをしたJAR細胞では酸化LDLを加えていない細胞に比べOil Red O 染色により中性脂肪の染色が見られた。8-iso-PGF_{2α}と酸化LDLを加えた細胞では、さらに染色された。

考察

トロホプラスト由来のJAR細胞に8-iso-PGF2aを加えると、血管内皮のスカルベンジャーレセプターであるLOX-1の発現が上昇した。加えて、3つのNF- κ B binding siteをもつようにtransfectionしたJAR細胞を、8-iso-PGF2aとincubationさせるとreporter geneが活性化されることが示された。JAR細胞を8-iso-PGF2aとincubationさせると¹²⁵I標識した酸化LDLの取りこみが上昇し、酸化LDLとincubationしたJAR細胞で脂質染色が確認された。

妊娠すると8-iso-PGF2aが上昇するが、子癩前症時での8-iso-PGF2aの血漿中濃度でもこの実験で使用した濃度より低い。しかし、子癩前症時の脱落膜組織は、酸化ストレスや粥状動脈硬化での泡沫化細胞がみられ、8-iso-PGF2aの濃度は血漿中よりもはるかに高い。また、動脈硬化病変部やその血漿中においては、8-iso-PGF2a濃度が非常に高いことが報告されている。それゆえ8-iso-PGF2aを高い濃度で使用したこの実験は、子癩前症時の脱落膜のトロホプラストを研究する上で生理的に意味があると考えられる。8-iso-PGF2aもLyso-PCも動脈硬化のプラークに高い濃度で蓄積するが血漿中濃度は低い。またLysoPCは酸化LDL成分の40%をしめるが、血漿中ではLysoPC濃度は低く無視できるほどである。8-iso-PGF2aはLDLが酸化されるときに発生し、プラークでの高い濃度の8-iso-PGF2aとLysoPCはLDLの局所での酸化による可能性がある。

¹²⁵I-TC標識した酸化LDLのJAR細胞への取りこみを行なった実験で、抗LOX-1抗体を使用すると、抗体を使用しなかったときに比べ46%の取りこみが減少した。このことは40%から50%の酸化LDLの取りこみがLOX-1を介しているということを示唆し、血管内皮細胞において50%から70%の酸化LDLの取りこみがLOX-1によるという報告と一致する。NF- κ Bはre-dox sensitiveな転写因子であり、8-iso-PGF2aは酸化ストレスを表すマーカーである。この実験でNF- κ BをtransfectionしたJAR細胞が8-iso-PGF2aの濃度依存的にluciferase活性を上昇させていることが判明し、酸化ストレスマーカーである8-iso-PGF2aと、re-doxにより制御されるNF- κ Bとの関係を示した。LOX-1プロモーターにNF- κ Bサイトがあり8-iso-PGF2aによりLOX-1遺伝子が、NF- κ B siteで調節を受けて、トロホプラスト由来のJAR細胞にてLOX-1のmRNAと、蛋白の発現が上昇し、ligandとの結合、酸化LDLの取りこみも増大している。内皮細胞にて酸化LDLがLOX-1に結合するとNF- κ Bが活性化され細胞内の活性酸素種が上昇するという報告がされている。リガンドである酸化LDLがLOX-1をupregulateし、NF- κ Bの活性が重要な働きをするという報告もある。

血漿中において、LDLが酸化されると8-iso-PGF2aが産生される。そして子癩前症時には酸化LDLに対するautoantibodyの濃度が上昇するという事は子癩前症時に酸化ストレスが上がることと関係する。そして子癩前症時には脂質過酸化物が上昇し、抗酸化能力が下がる。酸化LDLによりLOX-1の発現が、ウシ内皮細胞とヒト内皮細胞で上昇し、ヒト内皮細胞ではAngiotensin IIによりLOX-1の発現と酸化LDL

の取りこみが上昇することが報告されている。このことは動脈硬化と高血圧の関係を示唆している。LOX-1のmRNAは胎盤、肺、腎などの血管系に多く存在し、LOX-1は内皮細胞やマクロファージなどの動脈硬化に重要な役割を果たす細胞に多く発現する。LOX-1はトロホプラストにも多く発現し、トロホプラストには中性脂肪が蓄積することを示した。また平滑筋細胞にはマクロファージ様のCD36が発現し、マクロファージ以外にも泡沫化細胞となることが報告された。このトロホプラストによる実験も、子癩前症時に螺旋動脈での泡沫化細胞の形成にLOX-1の発現が関与することを支持している。

接着性の強いトロホプラストが母体の螺旋動脈へ侵入しにくくなることにより、螺旋動脈でのリモデリングが抑制されて、子癩前症時にみられるような狭く、曲がりくねった、壁の厚い血管が見られるようになるのではないかと。このことは8-iso-PGF2aによりmatrix metalloproteinase-2やmatrix metalloproteinase-9の活性を減らしJAR細胞のらせん動脈への侵入も減らすという報告と一致する。すなわち、子癩前症時にLOX-1がらせん動脈での泡沫化細胞の形成の促進と、螺旋動脈へのトロホプラストの侵入を減少させている可能性がある。

③糖尿病は血管内皮細胞におけるLOX-1の発現を増強する

ストレプトゾトシンで処理すると、4週間で糖尿病ラット大動脈中のLOX-1のmRNAが3.2倍増加し、インシュリンを追加すると、増加したLOX-1はほぼ正常な範囲まで減少した。

免疫組織化学的な研究によって、糖尿病ラットの動脈では内皮の層が最も特異的に染色されることが示された。正常なラットの動脈では、LOX-1の発現は検出感度以下であった。内皮細胞が保存されていることはvon Willebrand factorに対する染色によって認識した。興味深いことに、糖尿病ラットの大動脈ではLOX-1の発現誘導は一樣ではなかった。肋間動脈、総頸動脈、腎動脈および腸骨動脈分岐部のような血管分岐部でLOX-1の発現がより頻繁に認められた。

しかしながら、LOX-1の発現は正常なラット動脈においては、同じ部位でもほとんど認められなかった。血管分岐部で内皮は複雑なシアストレスにさらされており、このような部位はアテローム性動脈硬化を引き起こしやすい部位であると一般に認められている。そのことはLOX-1の発現はin vivoにおいては血流学的な要因に密接に関係していることを示すものである。LOX-1の活性化は糖尿病では血流学的な力と代謝異常の相乗効果のために起こっていると考えられる。

数多くの証明によって、糖尿病ではLDLの酸化感受性が増加することが示唆されてきた。このことは、糖尿病ラットで血中LOX-1リガンド活性が上昇している可能性を示唆している。LOX-1のリガンドが競合的にBLOX-1-CHO細胞によるDiI-OxLDLの取込みを阻害する競合阻害アッセイを用いることによって、我々はLOX-1のリガンドが実際に糖尿病ラットの血清に蓄積されることを示した。ストレプトゾトシン

投与後4週間後の血清は用量依存的 (5-20%(v/v)) に BLOX-1-CHO細胞においてDiI-OxLDLの取込みを阻害したが、一方、コントロール群のラット血清ではごくわずかな阻害効果しか示さなかった。我々は LOX-1のリガンド活性は糖尿病の1週間後で観察されることを認めた。LOX-1のリガンド活性は長期間にわたって持続的に認められた。糖尿病ラットの血清をさらに分画すると、VLDL/LDL分画はHDL分画やLPDS分画よりもはるかに高い競合的な活性を示し、LOX-1のリガンドは主に糖尿病ラット血清のVLDL/LDL分画にあることが示唆された。このことはLOX-1の発現が糖尿病ラット血清中のVLDL/LDL分画により増加することに一致している。LOX-1がOxLDLのタンパク質の一部を認識するという我々の前の報告によれば、LOX-1によって認識される正確なエピトープはまだ決定させていないが、糖酸化の修飾を持つアポBタンパク質はLOX-1に対するリガンドである可能性が推察される。

ストレプトゾトシンを投与したすべての動物が実験期間中は高血糖であり高脂血症であった。ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットの血清はBAE細胞のLOX-1の発現を有意に引き起こした。ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットの血清をさらに細分化すると、VLDL/LDLがもっともLOX-1の発現を引き起こす分画であった。HDL分画ではほとんど影響はなく、リポタンパク質が欠損した分画では全血清に比べて非常にLOX-1の発現能力が減少した。一方、高濃度の糖を加えた正常ラット血清や正常ラットVLDL/LDL分画ではLOX-1の発現に影響を与えなかった。AGEの形成は糖尿病の組織で促進され蓄積される。AGE-BSAの添加によってLOX-1のmRNAの発現は時間的および用量依存的に増加したが、しかしコントロールのBSAでは認められなかった。したがって、高血糖それ自身は直接には影響をあたえず、むしろ糖尿病による複雑な代謝異常によってLOX-1の発現が増加することが重要だと推察される。

アテローム動脈硬化症に対する主な危険因子として、糖尿病はLDLの酸化を起しやすくすることによって一部はアテローム発生の活性化を引き起こす。内皮のOxLDL受容体であるLOX-1は高血圧と高脂血症によって著しく活性化され、そしてアテローム動脈硬化の病変に蓄積される。本研究において、さらに我々は糖尿病が血管内皮中のLOX-1の発現を増加させることを明らかにした。これらアテローム発生前の状態ではLOX-1の発現が増加するということは、アテローム発生時にはLOX-1が必要不可欠であることを示唆している。

我々は培養内皮細胞においてOxLDLが結合すると続いてLOX-1の発現が起こることを認め、このことはポジティブフィードバックの機構を介してLOX-1発現の自動調節が行われることを示唆している。糖尿病ラットでは、正常なラットに比べて血流中のLOX-1のリガンドや内皮細胞でのLOX-1の発現が増加しており、このことはin vivoにおいてautoregulationによりLOX-1活性化されていることを示唆している。LOX-1とそのリガンド間での相互作用の増加によって、高脂血症アテローム動脈硬化症と同様、糖尿病でのLOX-1の発現も制御されていると推察される。

結論として、我々は糖尿病では動脈内皮細胞のLOX-1の発現を増加させ、そして血流中のLOX-1のリガンド活性を増加させることを示した。LOX-1は糖尿病による血管障害の進展に関与していることが推察される。

④LOX-1は内皮細胞のAGE受容体として機能する AGEとBLOX-1-CHO細胞の相互作用

4℃におけるbinding assayの結果、 $[^{125}I]$ 酸化LDLとBLOX-1-CHO細胞の特異的かつ飽和する(saturable)結合がみられ、みかけのKd値は $6.6 \mu\text{g/ml}$ 、最大結合は $339\text{ng/mg cell protein}$ であった。この細胞が、十分量のBLOX-1を発現していることを示している。 $[^{125}I]$ AGE-BSAはBLOX-1-CHO細胞と特異的かつ飽和する(saturable)ように結合し、スクッチャード解析により、みかけのKd値は $6.6 \mu\text{g/ml}$ 、最大結合は $339\text{ng/mg cell protein}$ であるひとつの結合領域をもつことが明らかになった。このことはAGE-BSAがLOX-1のリガンドとしてはたらくことを示している。37℃においてインキュベーションすると、BLOX-1-CHO細胞に対する $[^{125}I]$ AGE-BSAのcell-associationは、濃度依存的に上昇した。一方、mock-transfectionしたCHO細胞ではcell-associationがみられなかった。しかし、酸化LDLとは対照的に、 $[^{125}I]$ AGE-BSAでは連続して起こるendocytic degradationが明らかなレベルでは起こらなかった。このことは、AGE-BSAは、BLOX-1-CHO細胞においてLOX-1に結合するが、endocytic degradationをうけないことが示唆された。

AGE-BSAと酸化LDLのcross-competition

LOX-1に対するAGEリガンドの結合をより理解するために、Competitive binding assayを行った。 $[^{125}I]$ AGE-BSAの細胞への結合は、非標識AGE-BSAまたは酸化LDLにより、80%以上阻害された。AGE-BSAだけでなく、メイラード反応の際中間体アルデヒドとして生成されるMG、glycoaldehyde、3-deoxyglucoseにより修飾されたBSAがAGEリガンドとしてはたらくかどうか検討した。AGE-BSAのBLOX-1-CHO細胞への結合に対する、MG修飾BSA(MG-BSA)やglycoaldehyde修飾BSA(GA-BSA)の阻害効果は、非標識AGE-BSAや酸化LDLと同等であった。一方、3-deoxyglucose修飾BSAではそのような阻害効果は得られなかった。同様の条件下で、 $[^{125}I]$ 酸化LDLの細胞への結合は、非標識酸化LDLによって大きく阻害されたが、検討した他のリガンドによる阻害効果は部分的であった。このような条件下で、AGE-BSAまたは酸化LDLは抗BLOX-1抗体によりそれぞれ60%、70%抑制されたが、コントロールIgGではまったく影響がみられなかった。

内皮細胞におけるAGE受容体としてのLOX-1

LOX-1は内皮細胞に高発現しているため、LOX-1が内皮細胞におけるAGE受容体としてはたらくかどうか検討した。培養BAECに対する $[^{125}I]$ AGE-BSAの結合は、非標識AGE-BSAによって75%、抗BLOX-1抗体によって50%阻害された(特異的結合の3分の2と一致する)が、コントロールIgGは影響しなかった。このことは、内皮細胞に対する $[^{125}I]$ AGE-BSAの特異的結合のうちかなりの部分が、LOX-1を介するこ

とを示唆する。

考察

我々は現在までに、AGE修飾タンパク質が、SR-A、CD36、SR-BIなどのスカベンジャー受容体のリガンドとしてはたらくことを示してきた。これらの研究を進展させ、AGEリガンドが、もうひとつの酸化LDLに対するスカベンジャー受容体LOX-1のリガンドとしてはたらくかどうか検討した。その結果、

AGE-BSAは明らかにBLOX-1-CHO細胞と高い親和性をもち、この結合は抗BLOX-1抗体により大きく阻害された。このことは、AGEリガンドがLOX-1によってリガンドとして認識されることを示している。検討したリガンドのうち、MG-BSAやGA-BSAはAGE-BSAと同様に効果的なリガンドとしてはたらい。MG-BSAはハツカネズミP388D1マクロファージで受容体を介したエンドサイトーシスを受けることが知られている。LOX-1はマウス腹膜滲出マクロファージにも発現しており、LOX-1はP388D1マクロファージにおいてMG-BSAのエンドサイトーシスを担う受容体かもしれない。同じように、MG-BSAでなくGA-BSAはSR-Aにより活性のあるリガンドとして認識される。MGやglycoaldehydeで修飾されたタンパク質は、N^ε-(carboxyl)lysine、imidazoleや他のAGE構造を生じることが知られているが、LOX-1との相互作用に決定的な構造は更なる研究により明らかにする必要がある。関連して、N^ε-(carboxyl)lysineはRAGEのリガンドとしてはたらくことが報告されている。

酸化LDLとAGE-BSAのBLOX-1-CHO細胞への結合は、SR-Aで報告されているように、non-reciprocal cross-competitionで特徴付けられる。最近、HDLに結合し、HDLコレステロールエステルの選択的取り込みを媒介する受容体SR-BIもまた、AGE受容体としてはたらくことが示された。AGE-BSAとHDLのcross-competition実験では、AGE-BSAとHDLの、SR-BIを過剰発現させたCHO細胞(CHO-SR-BI)に対する結合は、他のリガンドにより影響を受けなかった。このようなnon-reciprocal cross-competitionは、SR-BIやLOX-1に多様なリガンド結合領域が存在する可能性を示唆する。このことを検討するためには、それぞれのスカベンジャー受容体に、部位特異的変異を導入することが有用であろう。興味深いことに、酸化LDLとAGE-BSAはLOX-1と結合した後、酸化LDLはエンドサイトーシスをうけ分解されるが、AGE-BSAはそうではないという、それぞれ異なる運命をたどる。CHO-SR-BI細胞においてもまた、SR-BIと結合した後、AGE-BSAはエンドサイトーシスをうけ分解されるが、HDLはそうではないという、リガンドの異なるプロセッシングが観察される。更なる研究により、スカベンジャー受容体における特異的なリガンド結合領域とリガンドの異なる細胞内ソーティングの関係を明らかにしていく必要がある。

本研究においてもっとも生理学的に重要なのは、BAECに対するAGE-BSAの特異的結合の大部分はLOX-1を介するということである。このことは、LOX-1が初代培養内皮細胞に発現する主要なAGE受容体としてはたらくことを示唆している。RAGEは内皮細胞の代表的なAGE受容体として広く受け入れ

られている。可溶性RAGE(sRAGE)の腹膜内投与により、アポEノックアウト/ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスで動脈硬化の進展が大きく抑えられた。sRAGEの抗動脈硬化作用は、sRAGEが血漿や組織中のAGEリガンドを捕らえ、AGEとRAGEの相互作用を阻害したと説明できる。関連して、本研究では、LOX-1が明らかに内皮細胞におけるもうひとつのAGEリガンド受容体としてはたらくことを示した。sRAGEがAGEリガンドと複合体を形成することにより、AGE-RAGE相互作用を阻害しただけでなく、AGE-LOX-1相互作用を阻害したと考えるのが妥当であろう。このようにsRAGEの抗動脈硬化作用は、部分的には、LOX-1の機能を抑えたことによるのであろう。更なる知見を得るために、AGEリガンドとLOX-1の相互作用が、酸化LDLとLOX-1の相互作用によって引き起こされるような細胞内イベントを誘導するかどうか検討することが重要である。

⑤LOX-1を介したフィブロネクチンに対する接着

LOX-1を介するフィブロネクチンへの接着
ウシLOX-1遺伝子をCHO-K1細胞に安定発現させたBLOX-1-CHO、ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)のフィブロネクチンへの接着は、EDTA(+)の条件下でも接着がみられたことから、LOX-1を介する接着は2価イオン依存性の接着のみならず2価イオン非依存性の接着があることが示唆された。2価イオン非依存性の接着は、LOX-1のリガンドとして知られている酸化LDLやpoly(I)やdextran sulfateにより阻害された。2価イオン非依存性の接着はインテグリン依存性の接着を阻害するRGDSペプチドにより阻害されなかった。またBLOX-1-CHOのフィブロネクチンへの接着における血清の影響について検討したが、血清存在下のほうが接着性が落ちたことから、血清に含まれる何らかの因子がLOX-1とフィブロネクチンの接着を抑制している可能性が示唆された。なおタイプIコラーゲンにはBLOX-1-CHO、BAECに接着しなかった。以上のことからLOX-1が、フィブロネクチンに対する接着に関与していることが明らかとなった。

考察
血管内皮細胞と細胞外マトリックスの接着は、血管の機能を維持する上で重要な役割を果たしているといわれている。現在のところ血管内皮と細胞外マトリックスの接着には、インテグリンが重要であると言われていたが、今回、LOX-1がフィブロネクチンに対する接着を支持することが明らかとなった。低酸素下では、VEGF等の血管新生因子の発現により血管新生がおこることが知られている。血管新生が起きる際に血管内皮細胞の遊走が初めに起こるが、遊走の際に細胞外マトリックスの分解が遊走に先だって起こることが知られている。LOX-1は、血管新生がおこるとされている低酸素下で発現誘導を受けることが知られており、血管内皮細胞が遊走する際に細胞外マトリックスを分解するステップで重要な役割を果たしている可能性がある。実際ヒト動脈硬化巣における血管内膜新生血管内皮において、LOX-1の発現が上昇していることも知られており、低酸素下での新生血管内皮でのLOX-1の発現、LOX-1と細胞外マトリックスとの結合が血管内膜へ

の血管新生の過程で重要な役割を果たしていることが示唆される。

⑥LOX-1を介したグラム陽性菌、グラム陰性菌の接着

LOX-1高発現細胞 (BAEC、TNF- α 刺激したBAEC、BLOX-1-CHO) を利用して、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) やグラム陰性菌 (大腸菌) がLOX-1に結合しうるかを細菌接着アッセイにて検討した。LOX-1に結合したFITC標識したグラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) やグラム陰性菌 (大腸菌) を共焦点顕微鏡により観察したところ、FITC標識したグラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) やグラム陰性菌 (大腸菌) がLOX-1高発現細胞に結合している像のみならず食食されている像も観察された。またフローサイトメトリーによりLOX-1高発現細胞であるBLOX-1-CHOへの細菌の接着を定量的に測定したところ、CHO-K1に比べ有意に細胞に接着している細菌が多いことが明らかとなった。またこれらの接着は、抗LOX-1抗体やpoly(I)によって抑制された。LOX-1高発現細胞であるBAECで同様のことを行ったが、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) の接着は抗LOX-1抗体やpoly(I)によって抑制されたが、グラム陰性菌 (大腸菌) の接着は抗LOX-1抗体によって部分的に抑制されたが、poly(I)によっては抑制されなかった。TNF- α 刺激によりLOX-1を発現誘導させたBAECにて同様の実験を行ったところグラム陰性菌 (大腸菌) の接着は、TNF- α で刺激しない状態のBAECと比べて接着性が増したが、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) の接着に変化はなかった。このことからグラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) の接着には、LOX-1以外の他の分子が関与していることが示唆された。また動的状態での接着についても検討したが、静的状態の接着と同様であった。

考察

血管内皮への細菌の接着は、細菌が血流を介して多臓器に播種する際に非常に重要なステップであり、感染性心内膜炎等の病態を考える上で非常に重要である。今回LOX-1がグラム陰性菌、グラム陽性菌の血管内皮への接着を支持することが明らかとなったが、エンドトキシンとして知られているグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成するLPS (リポポリサッカライド) は、LOX-1に結合しないことが明らかとなっており、LOX-1はグラム陰性菌の他の細胞壁成分を認識していることが示唆される。

BAECにおいては、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) の接着はpoly(I)によって抑制されたが、グラム陰性菌 (大腸菌) の接着は抑制されなかったことから、グラム陰性菌の接着にはLOX-1以外の接着分子も血管内皮への接着に重要な役割を果たしていることが示唆された。

今回の結果は血管内皮細胞と細菌との接着におけるLOX-1の役割を示したものであるが、LOX-1は血管内皮細胞のみならず、マクロファージにも発現が認められ、特に炎症刺激後にマクロファージにおけるLOX-1の発現誘導がみられることが知られている。細菌に接着し、その後接着した細菌を食食し、細菌由来のペプチド抗原を提示することがマクロファ-

ジの主な役割であるが、マクロファージに発現するLOX-1が、細菌に接着し、その後接着した細菌を食食する過程で重要な役割を果たしている可能性がある。現にBLOX-1-CHOにおいて細菌が接着するのみならず、食食されている像が共焦点顕微鏡により確認されており、マクロファージを使用した実験の結果が待たれる。

⑦LOX-1のレクチン様ドメインにおける種の間で保存されたC末端に位置するアミノ酸残基のOxLDL結合における必要性

異なる種の間におけるLOX-1の構造比較

LOX-1はウシの大動脈からクローニングされたのが最初である。つづいて我々はヒト、ラット、マウス、ウサギのLOX-1をクローニングしてきた。今回の研究ではブタのLOX-1のcDNAをクローニングしている。配列は1578塩基にわたり、44塩基の5' 非翻訳領域および822塩基のオープンリーディングフレーム、709塩基の3' 非翻訳領域を含んでいる。オープンリーディングフレームは274アミノ酸からなるタンパク質をコードしておりヒトLOX-1と69%のホモロジーを有する。推定されるアミノ酸配列はLOX-1のレクチン様ドメインが高度に保存されていることを示している。特に6つあるシステインの位置は既知のすべての種についてよく保存されていることがわかる。LOX-1は構造的にレクチン様受容体に属し、C末端に一カ所のcarbohydrate-recognition domain (CRD)を有するタイプII型膜タンパク質である。レクチン様ドメインは他のレクチン様受容体と同じくリガンド結合部位として機能するとみられる。LOX-1のC末端の配列260から265の間に存在する少なくとも6つのアミノ酸は種を越えてよく保存されている。特に2つの塩基性アミノ酸がすべての種においてみられ、ウシLOX-1ではLys262/Lys263であり、一方ブタLOX-1はLysとArgが存在している。種を越えて存在するアミノ酸残基はLOX-1が機能するのに重要であると考えられる。

レクチン様ドメインはLOX-1のリガンド結合ドメインである

変異体を作る部位の対象はLOX-1が機能する上で重要な細胞外ドメインにした。レクチン様ドメインの欠損変異体(Δ Lectin, Table 1)はOxLDLの結合活性を損なっていた。さらに我々は末端より10アミノ酸を欠損した変異体(Δ 261)でもOxLDL結合能が損なわれていることを確認した。そしてレクチン様ドメインを欠損した状態ではLOX-1は老化細胞やアポトーシス細胞および負電荷をもつリン脂質に対する認識能および結合能を損なっていることも損なっていた。これらのことより特徴的なレクチン様構造がLOX-1のリガンド認識能に機能していることが示唆される。LOX-1変異体の細胞表面への発現は細胞膜を透過処理しない状態で抗V5抗体染色することにより確認した。LOX-1変異体のリガンド結合能損失は細胞膜表面への発現が損なわれたためではないことが確認された。

モノクローナル抗体の認識部位の特定

LOX-1のリガンド結合ドメインについて解析するにあたり、我々は2種類のモノクローナル抗体、5-2と

JTX-20を用いた。後者の方は機能を阻害する抗体である。ウシLOX-1を材料に欠損変異体を作り、それらに対し2種のモノクローナル抗体でウェスタンブロット解析を行った。エピトープ部位を比較すると、モノクローナル抗体5-2は2番目と3番目のシステイン残基間の158-172残基に結合エピトープを持ち、同じくLOX-1に対する抗体であるJTX-20はC末端の、先に示したOxLDLの結合部位261-270残基間に結合する。

C末端の10アミノ酸の解析

OxLDLの結合に機能するC末端の10アミノ酸について解析するため、我々は261-270残基の間についていくつかの変異体を作製した。このとき、すべてのシステイン残基は保持されたままになるのでLOX-1変異体の基本的な構造は天然型受容体のものかわらないと考えられる。268-270欠損体($\Delta 268$)はリガンド結合活性に遜色はみられなかった。Leu-266までの欠損($\Delta 266$)は結合活性を半分程度に減じ、Asn-265($\Delta 265$)では結合活性を損なう結果が示された。 $\Delta 266$ の点変異体Asn-265 \rightarrow Ala($\Delta 265A$)は $\Delta 266$ と同等のOxLDL結合活性がみられる一方、 $\Delta 266$ の点変異体Asn-265 \rightarrow Asp($\Delta 265D$)は結合活性を損なっていた。さらに欠失させた変異体($\Delta 262$ - $\Delta 264$)はOxLDLに対する結合能および取り込み能がみられなかった。これらの結果から、C末端の265番目までの部分がリガンド結合に必須であり、267番目までの部分が結合活性に関与することが示唆される。

興味深いことに、ウェスタンブロット解析より261-265のアミノ酸領域は中和抗体JTX-20の認識に必要であることが示された。リガンド結合活性に影響のする変異体はJTX-20による認識にも影響がみられる。ウェスタンブロット解析においてLOX-1タンパク質は2つのバンドとして検出される。これはN-結合型糖鎖修飾による修飾のされ方の違いによるものと考えられている。我々はLOX-1のN-結合型糖鎖修飾の違いによりOxLDLへの結合に影響がでることを報告しているが、Cys-260よりC末端側の変異はN-結合型糖鎖修飾部位に影響を与えない。実際、すべての変異体は5-2抗体によるウェスタンブロット解析において同様な2つのバンドのパターンとして検出される。したがって、変異体におけるOxLDLへの結合能の変化はアミノ酸の変換によるものであって糖鎖修飾の影響によるものではない。

考察

はじめに我々はLOX-1を大動脈の内皮細胞から同定した。それはOxLDLに対し細胞表面からエンドサイトーシスを行う受容体である。LOX-1は*in vitro*においては、OxLDLに対する取り込みはスカベンジャー受容体SR-AIに比べ比較的弱いことが示されている。DoiらはウシSR-AI導入COS細胞においてOxLDLの結合は4°Cで2.7ng/mgタンパク質、37°Cで6.0ng/mgタンパク質であることを報告している。今回の結果では、ウシLOX-1導入CHO細胞において、それぞれの値は4°Cで67ng/mgタンパク質、37°Cで109ng/mgタンパク質であった。これはそれぞれの受容体の発現箇所に関係すると思われる。SR-Aはファゴサイトーシスを行うマクロファージに主に発現する。LOX-1は、ファゴサイトーシスを行わない、内皮細胞に主

に発現がみられる。内皮細胞上のOxLDL受容体として、LOX-1の主立った役割はシグナル伝達に関与し、内皮細胞の機能変化をもたらす遺伝子発現誘導に関わるとみられる。しかし、OxLDLの取り込みが比較的に非能率的に行われることは、血管壁でのリポタンパク質の集積は限られた割合で行われる過程であるといえる。動脈壁でのリポタンパク質の集積のメカニズムは未だ完全には解明されていないが、我々はLOX-1が外因的なOxLDLの取り込みに顕著な役割を果たすことを明らかにしてきた。

LOX-1の有する特徴的なレクチン様構造は他のOxLDL受容体には見られないものである。したがって、構造と機能とのかわりを明らかにすることは重要な意味を持つものと考えられる。レクチン様ドメインは以前からリガンド結合部位であることが予測されてきた。今回の研究では、欠損変異体を用いた研究によりレクチン様ドメインのある特定の部分がリガンド結合およびエンドサイトーシスに重要な役割を果たすことが示された。この部位については、少なくとも2つの塩基性アミノ酸を含んだ6つのアミノ酸が種を超えて保存されていることがわかった。我々はさらに、レクチン様ドメインのC末端側の261-270番目の間におけるいくつかの欠損変異体と点変異体を作製してLOX-1のOxLDLに対する認識モチーフを同定した。6つのシステイン残基はすべての変異体において保持されているので、LOX-1の基本的な構造は変化していないと考えられる。このことは変異受容体の細胞表面への発現が正常に起きていることから示唆される。アミノ酸268-270の欠損体ではOxLDLの結合活性は損なわれなかったが、アミノ酸265-270を欠損したものでは結合活性が損なわれる結果が見られた。興味深いことに、ほとんどのレクチン様受容体は最後のシステイン残基に続いて、少なくとも4つのアミノ酸を持っている。C末端の残基の長さはレクチン様受容体のリガンド結合活性に普遍的に必要であると見られる。その一方で、Lys-262 \rightarrow Ala、Lys-263 \rightarrow AlaおよびAsn265 \rightarrow Aspのように正電荷を減じるような点変異はOxLDLに対する結合が顕著に減じられた。まとめるとレクチン様ドメインの正電荷およびC末端側の長さがLOX-1のリガンド結合に重要な役割をしていることがいえる。我々は6つのアミノ酸(260-265)がウシLOX-1におけるリガンド結合部位のひとつであることを示した。今回の研究ではアッセイに過剰量のOxLDLを用いているので、OxLDLの結合活性の減少はアフィニティーの変化を意味している。荷電に依存したメカニズムはLOX-1のOxLDLに対するアフィニティーがレクチン様ドメインの限定された部位において、規定されることを示唆する。レクチン様ドメインのC末端に位置する、よく保存されたLys/Arg残基は荷電相互作用によってリガンド結合を安定化させていることが考えられる。LDL上のアポリポタンパクB-100の正電荷を帯びたArgおよびLys残基はLDL受容体による認識に重要であることが知られている。LDLの酸化過程においてlipid peroxidationがアポリポタンパクB-100のリジン残基を修飾するアルデヒドの産生が起り、変性の原因となっている。最終的にOxLDLは強い負電荷を帯びることになりLOX-1リガンドとなると考

えられる。さらにウシLOX-1-CHO細胞へのOxLDLの結合および取り込みは、負電荷をもったpoly Iや carrageenansなどにより阻害を受けることからLOX-1とリガンドの相互作用に電荷が重要な役割を持つことが支持される。OxLDLの結合及び取り込みに機能するいくつかの受容体が同定され、スカベンジャー受容体として帰属されてきたが、それらの構造は異なるものであった。様々な研究によりOxLDLに対する結合メカニズムの解明が試みられてきた。SR-AI/IIのリガンド結合ドメインはコラーゲンドメインのリジンクラスターであることが示されている。CD36の酸化LDL結合ドメインは中和抗体の認識部位である immunodominant domainのアミノ酸155-183に位置することが示されている。最近になりPearceらはCD36のOxLDL結合はpHおよびイオン強度に左右されることを報告し、結合には静電的相互作用が重要であることを示唆した。LOX-1はそれらの受容体と同様の原理で、Lys-262とLys-263を含んだ正電荷を介したOxLDLへの結合をしていると見られる。さらに挙げられる点としては、Lys-262/Lys-263の正電荷はLOX-1の立体構造の安定に寄与していると思われることである。LOX-1はnatural killer (NK)細胞受容体を含んだタイプII C-型レクチンとタンパク質の配列と高い相同性を有している。最近の研究によりレクチン様NK細胞受容体の結晶構造が示された。報告されたNK細胞受容体のひとつ、CD94の構造はLOX-1のprototypeとしてとらえることができる。CD94に関する報告の中で、BoyingtonらはLys-175とGlu-104の間で架橋が起きていることを明らかにした。LOX-1のLys-262/Lys-263についても Asp-182/Glu-183のような酸性アミノ酸との間で架橋が存在する可能性がある。レクチン様ドメインのC末端の荷電した残基の点変異および欠損変異がLOX-1のリガンド結合に必須となる構造に変化をもたらしたことが示唆される。LOX-1中和抗体に対するエピトープがOxLDLの結合に必須の残基とちょうどオーバーラップしていた。このことは必須となるC末端の残基が、OxLDLに対する結合ポケットとしてのみならず、LOX-1分子の表面にさらされており、アンタゴニストに対しても相互作用しうる部位にあることを意味する。OxLDLは約300kDaほどの大きな分子でありLOX-1のOxLDLに対する結合ポケットは大きく広がったものである必要がある。LOX-1のリガンドを結合した状態の構造については未解明であるが、C末端の残基を標的としたLOX-1に対するアンタゴニストの開発は有用であると考えられる。まとめると、我々はLOX-1の構造と機能の関連について解析するため変異体作製による実験を行なった。LOX-1のレクチン様ドメインはOxLDL結合を介し、レクチン様ドメインのC末端に保存された残基がリガンド結合活性に重要であった。ここでの結果は動脈硬化治療につながる可能性があるLOX-1に対し、アンタゴニストをデザインする上で重要な情報となるであろう。

⑧LOX-1のレクチン様ドメインにおける塩基性アミノ酸リガンド結合における必要性

LOX-1のレクチン様ドメインはすべての種の間で保存されている。以前の研究により、我々はレクチンドメインがOxLDL結合ドメインであることを示した。LOX-1のレクチンドメインでは6つのシステインが種を超えて完全に保存されている。他のC型レクチン様分子と比較して、ウシLOX-1において3つのジスルフィド結合、Cys140[Cys(I)]とCys151[Cys(II)]; Cys168[Cys(III)]とCys260[Cys(VI)]; Cys239[Cys(IV)]とCys252[Cys(V)]が形成されていると見られる。システイン残基の変異はジスルフィド結合に変化をもたらすので、LOX-1の基本構造に影響を与えると考えられる。実際に、Cys252のアラニンへの変異はOxLDLの結合を損なう結果をもたらした。それゆえ、今回の実験はすべてのシステイン残基は欠損及び点変異体を作るにあたって、保持させた。

以前の研究で、我々はLOX-1の中和抗体が認識する、C末端の9アミノ酸がOxLDLの結合に機能することを示した。さらにLOX-1のOxLDLに対する結合に必要な構造を特定するために、ウシLOX-1のネックドメインを欠損した変異体およびレクチン様ドメインにおける欠損変異体を作製した。

ネックドメインの欠損はOxLDLの結合及び取り込みに影響しなかったが、レクチン様ドメインの欠損は結合活性を損なう結果になった。したがって、LOX-1のネックドメインはリガンド認識に直接関与しないと見られる。対照的に、 $\Delta 195-225$ はOxLDL結合活性を失ったことから、レクチン様ドメインのCys(III)とCys(IV)の間にある31アミノ酸は構造維持に重要であることが示唆される。LOX-1のアミノ酸配列はCD94、NKG2D、Ly49-AなどのようなNK受容体とホモロジーを有する。LOX-1のCys(III)とCys(IV)の間の残基はCD94の結晶構造からして表面に露出していると予測される。

正電荷を帯びた残基はスカベンジャー受容体においてリガンド-受容体の相互作用に重要であることが示されているが、その一次構造は必ずしも共通していない。SR-AI/IIのコラーゲンドメインにおけるリジンクラスターはOxLDLの結合サイトとなっている。最近PearceらはCD36へのOxLDLの結合がpHおよびイオン強度感受性であることを報告しており、結合には静電的な相互作用が重要であることが示されている。したがって、LOX-1のOxLDLへの結合が、他のスカベンジャー受容体と同様に、正電荷を帯びた残基のクラスターを介して起きていると想定できる。

レクチンドメインにおける塩基性アミノ酸の3つのクラスター（ウシLOX-1においてはR205/K206; R225/R232/R244; K262/K263）がすべての種において保存されている。K262/K263の重要性については以前に報告している。ここでは $\Delta 195-225$ のうちの欠損したアミノ酸より正電荷をもったものについて焦点を当てた。この領域におけるアルギニン/リジンのアラニンへの変換を行なった一連の変異体について解析した。

ウシLOX-1のR205、K206、R225、R232およびR244に対する点変異体の導入は4°Cにおけるリガンド結合活性を損なう結果になり、37°Cでの取り込み活性ではより顕著に見られたが、それぞれの損失の程度に幅があった。それらにおいて、R225の変異体は結